

523,098

(2)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2004年2月26日 (26.02.2004)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 2004/016798 A1

- (51) 国際特許分類:  
(C12P 13/02, C12R 1:38) C12P 13/02 //
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2003/005077
- (22) 国際出願日: 2003年4月22日 (22.04.2003)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:  
特願2002-229026 2002年8月6日 (06.08.2002) JP
- (71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 太陽化学株式会社 (TAIYOKAGAKU CO.,LTD.) [JP/JP]; 〒510-0825 三重県 四日市市 赤堀新町9番5号 Mie (JP).
- (72) 発明者; および  
(75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 立木 隆 (TACHIKI,Takashi) [JP/JP]; 〒606-0831 京都府 京都市 左京区下鴨北園町107 Kyoto (JP). 岡田 幸隆 (OKADA,Yukitaka) [JP/JP]; 〒510-0825 三重県 四日市市 赤堀新町9番5号 太陽化学株式会社内 Mie (JP). 小関 誠 (OZEKI,Makoto) [JP/JP]; 〒510-0825 三重県 四日市市 赤堀新町9番5号 太陽化学株式会社内 Mie (JP). 大久保 勉 (OKUBO,Tsutomu) [JP/JP]; 〒510-0825 三重県 四日市市 赤堀新町9番5号 太陽化学株式会社内 Mie (JP). ジュネジャ レカ ラジュ (JUNEJA,Lekh Raj) [IN/JP]; 〒510-0825 三重県 四日市市 赤堀新町9番5号 太陽化学株式会社内 Mie (JP).
- (74) 代理人: 小林 洋平 (KOBAYASHI,Youhei); 〒511-0821 三重県 桑名市 矢田261番地6号 Mie (JP).
- (81) 指定国(国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国(広域): ARIPO特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:  
— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイドスノート」を参照。

(54) Title: PROCESS FOR PRODUCING THEANINE

(54) 発明の名称: テアニンの製造法

WO 2004/016798 A1

(57) Abstract: It is intended to provide a novel process for efficiently producing theanine, thereby enabling convenient and industrially advantageous production of theanine. *Pseudomonas citronellosis* GEA, which has been newly isolated from soil in nature and selected, is a theanine-producing strain belonging to the species *citronellosis* of the genus *Pseudomonas* and showing a  $\gamma$ -glutamyl transfer reaction. Theanine can be highly efficiently produced, compared with the existing methods, by using glutaminase originating in the above strain in a mixture of glutamine with ethylamine at pH 9 to 12.

(57) 要約: 本発明は、テアニンの効率的な新規製造法を提供し、簡易かつ工業的に有利なテアニン生産を可能とすることを目的とする。本発明者らが自然界の土壤より新規に分離・選定した *Pseudomonas citronellosis* GEA は、属: *Pseudomonas*、種: *citronellosis*に属し、 $\gamma$ -グルタミル基転移反応を有するテアニン生産菌である。この生産菌由来のグルタミナーゼをグルタミンとエチルアミンの混合物中にpH9~12の条件下で用いることにより、従来の方法に比べると非常に効率的にテアニンを製造することができる。

## 明細書

## テアニンの製造法

## 技術分野

5 本発明は、テアニンの新規な製造法に関する。

## 背景技術

テアニン (theanine) は緑茶の旨味の主要成分として知られており、茶をはじめとする食品の香味物質として重要な物質である。また一方、テアニンを含めて  
10 メチルタミル誘導体は、動・植物体における生理活性物質として作用することが指摘されている。例えば、Chem. Parm. Bull., 19(7), 1301-1307(1971). 同  
19(6), 1257-1261(1971). 同34(7), 3053-3057(1986). 薬学雑誌, 95(7), 892-895  
(1975) 等の文献には、テアニンやグルタミンがカフェインによって誘発される痙  
攣に拮抗することが報告されている。このことから、これらの化合物が中枢神経  
15 系に作用することが考えられ、生理活性物質としての有用性が期待されている。

従来より、テアニンの製造法としては、テアニンを含有する玉露の生産用茶園  
において得られる茶葉乾燥物より抽出する方法が一般的である。しかし、テアニンは、茶葉乾燥物あたりわずかに 1.5 % 前後程度しか蓄積されないことに加え、  
一般の煎茶用茶園の茶葉は光合成が活発であるため、テアニンが速やかに分解さ  
れてしまうことから、充分な収量を確保することが困難である。従って、茶葉乾  
燥物からの抽出法では、工業的に実用的ではないことが指摘されている。

このようなことから、工業的生産方法の開発が期待されており、その一つとし  
て、テアニンを化学的に有機合成する方法が報告されている (Chem. Parm.  
Bull., 19(7), 1301-1308(1971))。しかし、このような有機合成反応では、収率が  
25 低く、合成物の分離精製等において煩雑な操作を必要とするという問題点が指摘  
されている。

また、グルタミナーゼの $\gamma$ -グルタミル基転移反応を利用して、グルタミン、エチルアミンからテアニンを合成する酵素法も報告されている（特公平 07-55154号）。しかし、グルタミナーゼの加水分解反応によってテアニンと同時に副合成されるグルタミン酸の存在が、テアニン精製を煩雑にするという問題点がある。

5 本発明は、上記事情に鑑みてなされたものであり、その目的は、テアニンの効率的な製造法を提供し、簡易かつ工業的に有利なテアニン生産を可能とすることにある。

#### 発明の開示

10 本発明者らは前記の課題を解決するために、自然界の土壌より新規テアニン生産菌の分離・選定を重ねた結果、特定の微生物が持つグルタミナーゼの性質が特公平 07-55154 にて報告されている *Pseudomonas nitroreducens* IFO 12694 のグルタミナーゼに比べ高いテアニン合成活性・低いグルタミン酸合成活性であることを見い出し、基本的には、本発明を完成するに到った。上記のテアニン生産菌  
15 は、本発明者らが初めて発見・同定した新規菌株であり、*Pseudomonas citronellosis* GEA（寄託機関の名称：独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター、あて名：日本国茨城県つくば市東一丁目1番地1中央第6、寄託日：平成14年7月31日、受託番号：F E R M B P - 8 3 5 3）である。

本発明によれば、テアニンの効率的な新規製造法を提供し、簡易かつ工業的有  
20 利な生産を可能とすることができます。

#### 図面の簡単な説明

第1図は、テアニンのIRスペクトルを示したものである。

#### 発明を実施するための最良の形態

次に、本発明の実施形態について、詳細に説明するが、本発明の技術的範囲は、  
25 下記の実施形態によって限定されるものではなく、その要旨を変更することなく、  
様々に改変して実施することができる。また、本発明の技術的範囲は、均等の範

囲にまで及ぶものである。

本発明におけるテアニンとは、 $\gamma$ -グルタミルエチルアミド、L-グルタミン酸- $\gamma$ -エチルアミドなどである。テアニンは茶の旨味成分であって、呈味を用途とする食品添加物として使用されている。

5 本発明に用いる*Pseudomonas citronellosis* GEA（受託番号 F E R M B P – 8353）とは、本発明者らによって新規に見出された菌株であり、属：*Pseudomonas*、種：*citronellosis* に属し、 $\gamma$ -グルタミル基転移反応を有するテアニン生産菌である。また、本発明に用いる *Pseudomonas citronellosis* GEA の同定は、定法に基づいた菌学的性質・生化学的性質の解析、および16s rRNAに相  
10 当するDNAの塩基配列を既知の微生物と比較することにより行ったものである。

本発明におけるグルタミナーゼとは、*Pseudomonas citronellosis* GEA 由来の酵素である。この反応の酵素源としては、生菌体または各種処理標品、例えば菌体磨碎物、超音波処理菌体、溶剤処理菌体、低温乾燥菌体、硫安塩析物、精製酵素標品などをそのまま、あるいは固定化したものが使用できる。本発明において効率的な酵素反応を行うためには、pHは9～12の範囲が好ましく、10～11がより好ましい。また、反応温度は10°C～55°Cが好ましく、25°C～35°Cがより好ましい。

20 このようにして得られる反応液からのテアニンの単離精製は、公知の方法が用いられる。例えば、各種クロマトグラフィー（例えば、溶媒分配クロマトグラフ  
25 ィー、HPLCなど）を組み合わせることにより容易に行うことができる。

以下、実施例によって本発明をより詳細に説明するが、本発明の技術的範囲はこれらのみに限定されるものではない。

### 実施例

25 実施例1 テアニン資化性菌の分離

滋賀県・京都府の土壤を採取、土壤懸濁液を調製した後に、テアニンを炭素源

とする選択培地（テアニン0.5%、酵母エキス0.03%、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.05%、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.05%、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.03%、pH 7）による継代培養を3回行うことにより、テアニン資化性菌を100株分離した。

#### 実施例2 無細胞抽出液の調製

5 実施例1の選択培地にて、100株のテアニン資化性菌をそれぞれ1リットルで30°C、20時間培養した。その後、集菌・洗浄を行い、30mMリン酸カリウム緩衝液（pH 7.0）50ミリリットルに懸濁し、5°C～20°Cで超音波破碎し、無細胞抽出液を得た。

#### 実施例3 酵素反応

10 実施例2の無細胞抽出液を用いて、グルタミン0.3M、エチルアミン0.6Mを含有する100mMホウ酸緩衝液（Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>-NaOH、pH 11）中で30°C、24時間酵素反応を行い、テアニンを合成した。

#### 実施例4 テアニン合成活性・グルタミン酸合成活性の測定

15 実施例3にてテアニン合成を行った酵素反応液を適宜希釈し、逆相HPLCを行うことによりテアニン・グルタミン酸の合成量をそれぞれ定量した。分析条件は、次の通りであった。分析カラムとして、Develosil ODS HG-5（野村化学㈱）を用い、検出器は、Waters2487 デュアルλUV/VIS 検出器（Waters 社製）を使用した。また、内部標準物質として、ニコチンアミド（ナカライトスク（株））を用いた。移動相は、純水：メタノール：トリフルオロ酢酸=980：20：1の割合で混合したもの用いた。

#### 比較例1

100株のテアニン資化性菌との比較株として、*Pseudomonas nitroreducens*の無細胞抽出液を用いて、テアニン合成活性およびグルタミン酸合成活性の測定を行った。

25 試験例1 テアニン合成活性を指標としたテアニン資化性菌群からの高テアニン生産菌の選別

実施例 1 にて分離したテアニン資化性菌 100 株の無細胞抽出液を各菌株毎にそれぞれ実施例 2 の方法で調製し、実施例 3 の方法で酵素反応を行い、実施例 4 の方法でテアニン合成量を調べた。その結果、従来報告されている *Pseudomonas nitroreducens* のテアニン合成活性に比べて、4 倍以上高い活性を持つ新規テア

5 ニン生産菌の 1 菌株を得ることに成功した。

表 1

	テアニン合成活性	グルタミン酸合成活性
<i>Pseudomonas nitroreducens</i>	2.1	2.2
新規テアニン生産菌	9.6	2.6

単位 : mM/(h · mg)

#### 10 実施例 5 新規テアニン生産菌の同定

試験例 1 で得られた新規テアニン生産菌の菌学的・生化学的性質を定法に従い、次の項目、すなわちグラム染色、細胞形態、カタラーゼテスト、硝酸塩還元能、ピラジナミダーゼ、ピロリドニルアリルアミダーゼ、アルカリフェオヌクレアーゼ、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ、 $\beta$ -グルクロニダーゼ、 $\alpha$ -グルコシダーゼ、N-アセチ

15 ル- $\beta$ -グルコサミニダーゼ、ウレアーゼ、ゼラチン液化能、エスクリン利用能、グルコース利用能、リボース利用能、キシロース利用能、マンニトール利用能、マルトース利用能、乳糖利用能、白糖利用能、グリコーゲン利用能について試験を行った。これらの試験成績に基づいて、Bergery's manual (8 版) を参照した結果、菌の属は *Pseudomonas* であることを結論づけた。

20 また、16S rRNA に相当する DNA 塩基配列を決定し、既知微生物の同配列との比較を行った。この結果、本菌株を属 : *Pseudomonas*、種 : *citronellosis* と同定し、新種の菌であることより *Pseudomonas citronellosis GEA* と命名した。

#### 実施例 6 *Pseudomonas citronellosis GEA* の培養条件の最適化

実施例 1 における菌選択培地（炭素源：テアニン）以外の炭素源を用いた培地

による *Pseudomonas citronellosis* GEA の培養を検討した。炭素源として、グルタミン、グルタミン酸、グルコース、グリセロールなどを検討した結果、グリセロールを用いた時に最も良好な結果を得た。次に培地中のグリセロール濃度を検討した結果、3 %グリセロールで最も良好なテアニン合成活性を持つ無細胞抽出液を得ることができた。同時に、酵母エキス濃度を検討したところ、0.3 %で最も良好なテアニン合成活性を持つ無細胞抽出液を得ることができた。

表 2

		グリセロール 1 %	グリセロール 2 %	グリセロール 3 %
酵母エキス 0.1%	テアニン合成活性	1.02	1.01	1.05
	グルタミン酸合成活性	0.34	0.38	0.41
酵母エキス 0.3%	テアニン合成活性	1.21	3.33	4.35
	グルタミン酸合成活性	0.43	0.25	0.30
酵母エキス 0.5%	テアニン合成活性	1.18	1.33	2.02
	グルタミン酸合成活性	0.54	0.45	0.48

単位 : mM/(h · mg)

実施例 7 *Pseudomonas citronellosis* GEA 由来の無細胞抽出液を用いた酵素10 反応条件の最適化

実施例 1 における酵素反応条件で、*Pseudomonas citronellosis* GEA 由来の無細胞抽出液を用いた時のグルタミン、エチルアミンの種々の濃度を検討した。この結果、0.3 Mグルタミンと0.9 Mエチルアミンを用いて48時間反応した時に、最大のテアニン合成量を得ることができた。

15 表 3

エチルアミン	グルタミン 0.2M		グルタミン 0.3M		グルタミン 0.4M	
	The	Glu	The	Glu	The	Glu
0.3M	74.7(72)	10.7	98.3(72)	13.7	80.0(48)	33.3
0.6M	81.6(60)	5	147(72)	8.1	115(72)	19.1
0.9M	157(60)	3.1	166(48)	6.6	120(72)	6.2
1.2M	155(72)	2.7	160(60)	5.2	97.1(72)	4.4

The : テアニン、Glu : グルタミン酸、( ) 内は反応時間 (単位 : 時間)、単位 : mM

実施例 8 *Pseudomonas citronellosis* GEA を用いたテアニン製造

グリセリン 3.0%、酵母エキス 0.3%、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.05%、 $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.05%、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.03%を含む培養液 20 リットルを用いて、30 リットル容のジャーファメンター (30°C、回転数 2000 rpm) 中、*Pseudomonas citronellosis* GEA を 20 時間培養した。培養後、遠心分離による集菌・洗浄を行い菌体 180 g 得た。

調製した菌体 10 g を用いて、0.3 M グルタミン、0.9 M エチルアミン、pH 10、30°C の条件で酵素反応を行ったところ、24 時間後に 1 リットルあたり 40 g のテアニンを得た。テアニンの反応液からの単離精製は、反応液より菌体を除去した後に、Dowex 50×8、Dowex 1×2 カラムクロマトグラフィーにかけ、これをエタノール処理することにより行った。

この単離物質をアミノ酸アナライザー、ペーパークロマトグラフィーにかけると、標準物質と同じ挙動を示し、塩酸あるいはグルタミナーゼで加水分解処理を行うと、1 : 1 の割合で、グルタミン酸とエチルアミンを生じた。このように、単離物質がグルタミナーゼによって加水分解されたことから、エチルアミンがグルタミン酸の  $\gamma$  位に結合していたことが示される。また、加水分解で生じたグルタミン酸が L 型であることも、グルタミン酸デヒドロゲナーゼ (GluDH) により確認された。図 1 には、テアニン標品の IR スペクトルを示した。単離物質は、図 1 の IR スペクトルと同一のスペクトルが得られた。これらの結果から、単離物質がテアニンであることが確認された。

実施例 9 *Pseudomonas citronellosis* GEA 由来グルタミナーゼ固定化酵素を用いたテアニン製造

(1) 無細胞抽出液の採取

実施例 8 で得られた菌体 160 g を洗浄後、30 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) 2 リットルに懸濁し、5°C～20°C で超音波破碎し、無細胞抽出液を得た。

(2) 硫酸アンモニウム分画の採取

上記（1）で得られた無細胞抽出液2リットルに7%アンモニア水でpHを7に調整しながら硫酸アンモニウムを添加した。35%飽和溶液を得た段階で、遠心分離により沈殿を取り除き、再び硫酸アンモニウムを添加した。90%飽和溶液を得た段階で一晩放置し、遠心分離により沈殿を回収し、これを0.01Mリン酸カリウム緩衝液に溶かし、同緩衝液に対して透析を行い、透析酵素液を得た。

5 (3) DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィーを用いた精製

上記（2）で得られた透析酵素液を0.01Mリン酸カリウム緩衝液で緩衝化した。次にDEAE-セルロースカラム（15×60cm）に吸着させ、グルタミナーゼを0.1Mの食塩を含む緩衝液で溶出した。この結果、グルタミナーゼ粗精

10 製品800mgを得た。

(4) 固定化グルタミナーゼの調製

予め、水で膨潤させた市販の固定化担体であるキトパール3510（富士紡績（株））を十分に水洗した後0.1Mリン酸ナトリウム（pH6.8）で平衡化した。この湿润担体2gを上記（3）にて調製したグルタミナーゼ粗精製品35mgを含む5mlの20mMリン酸ナトリウム（pH6.8）に懸濁し、4℃で一晩攪拌した。更に、グルタルアルデヒドを終濃度2.5%（V/V）で添加し、4℃で3時間放置することにより架橋した。以上の操作により得られた固定化酵素を0.1Mリン酸ナトリウム（pH6.8）で十分に洗浄し、4℃で保存した。

(5) 固定化グルタミナーゼによる酵素反応

20 上記（4）で作製した固定化グルタミナーゼに、基質溶液（4%グルタミン、25%エチルアミン pH10.0）を30℃、SV=0.2の流速で通筒した場合、65%の收率でテアニンを得ることができた。テアニンの反応液からの単離精製は、反応液をDowex 50×8、Dowex 1×2カラムクロマトグラフィーにかけ、これをエタノール処理することにより行った。

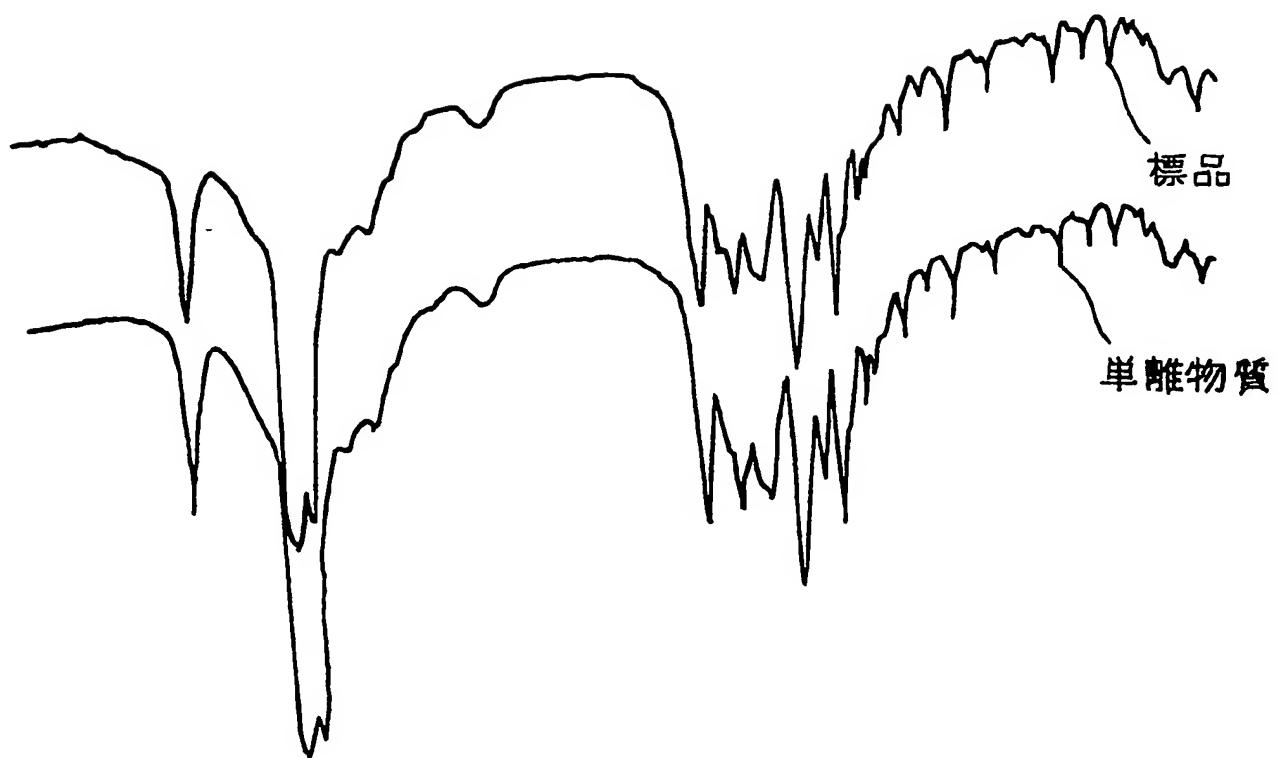
25 この単離物質をアミノ酸アナライザー、ペーパークロマトグラフィーにかけると、標準物質と同じ挙動を示した。また、塩酸あるいはグルタミナーゼで加水分

解処理を行うと、1：1の割合でグルタミン酸とエチルアミンを生じた。このよ  
うに、単離物質がグルタミナーゼによって加水分解されたことから、エチルアミ  
ンがグルタミン酸の $\gamma$ 位に結合していたことが示された。また、加水分解で生じ  
たグルタミン酸がL型であることも、グルタミン酸デヒドロゲナーゼ (G LD  
5 H) により確認された。テアニンのIRスペクトル分析を行ったところ、標品、  
単離物質とともに、実施例8と同様のスペクトルが得られた。これらのことから、  
単離物質がテアニンであることが確認できた。

## 請 求 の 範 囲

1. *Pseudomonas citronellosis GEA* を用いることを特徴とするテアニンの製造法。
2. *Pseudomonas citronellosis GEA* 由来のグルタミナーゼを用いることを特徴とする請求項 1 に記載のテアニンの製造法。

## 第1図



## A. 発明の属する分野の分類(国際特許分類(IPC))

Int. Cl' C12P 13/02 // (C12P 13/02, C12R 1:38)

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料(国際特許分類(IPC))

Int. Cl' C12P 13/00-13/24

## 最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

## 国際調査で使用した電子データベース(データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS/WPI(DIALOG), CA/REGISTRY(STN)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP 11-225789 A (太陽化学株式会社) 1999. 08. 24 (ファミリーなし)	1-2
A	JP 5-328986 A (太陽化学株式会社) 1993. 12. 14 (ファミリーなし)	1-2
A	JP 5-68578 A (太陽化学株式会社) 1993. 03. 23 (ファミリーなし)	1-2

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献(理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

## の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

## 国際調査を完了した日

08. 05. 03

## 国際調査報告の発送日

27.05.03

## 国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

## 特許庁審査官(権限のある職員)

三原 健治

4 N 2937



電話番号 03-3581-1101 内線 3488